

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-51099

(43)公開日 平成7年(1995)2月28日

(51)Int.Cl.<sup>8</sup>

識別記号 庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C12Q 1/68

A 9453-4B

C12M 1/34

B

E

審査請求 未請求 請求項の数7 OL (全8頁)

(21)出願番号

特願平5-199644

(71)出願人 000003160

東洋紡績株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号

(72)発明者 植松 宏彰

滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋紡  
績株式会社総合研究所内

(72)発明者 林 聰子

滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋紡  
績株式会社総合研究所内

(72)発明者 中島 隆

滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋紡  
績株式会社総合研究所内

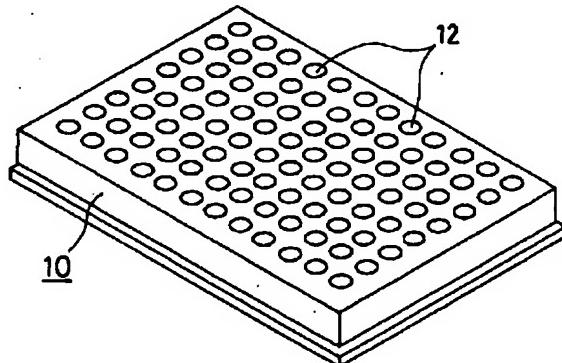
(74)代理人 弁理士 平木 祐輔 (外2名)

(54)【発明の名称】 核酸配列検査方法及び検査装置

(57)【要約】

【目的】 測定対象物である培養菌などを、前処理することなく直接固相担体である膜に固定でき、そのまま試薬を注入するだけで各工程処理を行うことができ、短時間で多量の検体を高感度に検出できる核酸検査方法及び検査装置を提供する。

【構成】 合成樹脂からなる筒状体の一方の開口部を開塞するように、少なくとも表面が親水性かつカチオン性である多孔質膜を接着又は圧着して底部となしたウェル型多孔質膜プレート10を用い、その多孔質膜上に標的核酸を固定した後、ハイブリダイゼーション法により試料中の標的核酸を検出する。各工程でウェル12に注入した試薬は、真空吸引により多孔質膜を介して排出する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】 合成樹脂からなる筒状体の一方の開口部を閉塞するように、少なくとも表面が親水性かつカチオン性である多孔質膜を前記開口部の縁部に接着又は圧着したことを特徴とするウェル型多孔質膜プレート。

【請求項 2】 複数個の筒状体が側壁の少なくとも一部で結合して直線的に連結していることを特徴とする請求項 1 記載のウェル型多孔質膜プレート。

【請求項 3】 上下が開口した複数の貫通孔をマトリックス状に配列して形成した板状合成樹脂部材の一方の表面に、前記複数の貫通孔の開口部を夫々閉塞するように少なくとも表面が親水性かつカチオン性である多孔質膜を接着又は圧着したことを特徴とするウェル型多孔質膜プレート。

【請求項 4】 各々が加熱手段を有する上部金属プロックと下部金属プロックとからなり、少なくとも一方の金属プロックが隣接面に凹部を有して、該凹部に請求項 1、2 又は 3 記載のウェル型多孔質膜プレートを収納できる温度調整ユニットと、溶液排出手段と、制御手段とを含み、

前記温度調整ユニットの下部金属プロックは、所定の領域を囲み、その上に載置されるウェル型多孔質膜プレートの底面と下部金属プロックとの間に密閉空間を形成するシールパッキング部を上面に有すると共に、前記シールパッキング部で囲まれた領域と下部金属プロックの外部空間とを連通させる連通孔を有し、前記溶液排出手段は前記下部金属プロックに設けられた連通孔を介して前記密閉空間を排気することにより、ウェル型多孔質膜プレートのウェル内の溶液を吸引排出可能に構成されていることを特徴とする核酸配列検査装置。

【請求項 5】 前記制御手段は、ウェル型多孔質膜プレート内での試料の溶菌及び／又は変性工程、ウェル型多孔質膜プレートへの標的核酸の固定化工程、多孔質膜上で核酸が固定されたスポット以外をプロック溶液で覆うプレハイブリダイゼーション工程、標識核酸と標的プローブとのハイブリダイゼーション工程、B／F 分離工程、及び標識の検出工程ごとに調整温度、工程時間、及び溶液の排出を制御するものであることを特徴とする請求項 4 記載の核酸配列検査装置。

【請求項 6】 請求項 1、2 又は 3 記載のウェル型多孔質膜プレート上に試料中の標的核酸を固定した後、標識プローブを用いて、ハイブリダイゼーション法により試料中の標的核酸を検出することを特徴とする核酸配列検査方法。

【請求項 7】 請求項 1、2 又は 3 記載のウェル型多孔質膜プレート内に試料を付着させる工程と、前記多孔質膜プレート内で試料を溶菌及び／又は変性する工程と、前記ウェル型多孔質膜プレートの多孔質膜に標的核酸を固定する工程と、多孔質膜上で核酸が固定されたスポット以外をプロック溶液で覆うプレハイブリダイゼーショ

ン工程と、標的核酸と標識プローブとのハイブリダイゼーション工程と、B／F 分離工程と、標識を検出する工程とを含むことを特徴とする核酸配列検査方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、核酸ハイブリダイゼーション法により病原体や遺伝子を検出する方法及び装置に関する。

【0002】

【従来の技術】 近年、遺伝子診断方法として、DNAプローブを用いた核酸配列検査方法が提案されている。DNAプローブを用いた核酸ハイブリダイゼーション法は、核酸の配列の相補性を利用した特異性の高い測定方法であり、菌体中の核酸を抽出した後、ニトロセルロース膜上に固定してハイブリダイゼーションを行うドットプロットハイブリダイゼーション法、核酸をそのまま又は制限酵素で切断し電気泳動により分画し、ニトロセルロース膜などにトランスファーしてハイブリダイゼーションを行うサザンプロット法などが知られている。

【0003】 しかし、このような核酸配列検査方法は、検体から菌体を取り出した後、十分精製する必要があり、前処理段階でも操作が煩雑で長時間を要する。また、膜上に固定した試料核酸とハイブリダイゼーションを行う操作も膜の移し替えや試薬の交換など操作が煩雑で、多検体を一度に処理する臨床検査には適していない。免疫検査によく使われるものとしてマイクロプレートがある。このマクロプレートの場合、操作性においては優れているものの、試料中の高分子である核酸を直接固定するには長時間を要する、膜に比べ固定できる核酸量が少ないため検出感度が悪い、固定するためには必ず検体の前処理が必要であるなどの問題があるため、迅速で簡易な検査用には適していない。

【0004】 また、ウェル型診断用プレートとして特開昭 63-167267 号公報に示されたものがある。このプレートは膜を親水性、半疎水性、疎水性膜で構成された三層構造にし、ウェル型多孔質膜プレートの形態とすることで、注入した溶液を長時間にわたって保持することができる長所を有する。しかし、三層膜にすることでコスト高になり、三層を構成する膜の材質の選択によっては発色用基質液と反応してしまいプランク値が高くなる、あるいは多孔質膜プレートの形態にすると三層構造故に前の液が完全には排出されないので常に共洗いをする必要があるなどの短所もあった。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の第一の目的は、測定対象物である培養菌などを、前処理することなく直接固相担体である膜に固定でき、ハイブリダイゼーションや B／F 分離工程においても膜を容器に移し替えることなく試薬を注入するだけで反応させうる専用容器を用いて多検体を短時間で一度にハイブリダイゼーショ

ンし、高感度に検出できる核酸配列検査方法を提供することである。本発明の第二の目的は、上記専用容器を設置した後、各工程において試薬を注入するだけでハイブリダイゼーションなどが自動的に行われる検査装置を提供することである。

#### 【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、親水性かつカチオン性の多孔質膜を筒状体の一方の開口部の縁部に接着あるいは圧着して容器の形状に形成したウェル型多孔質膜プレート、及びこのウェル型多孔質膜プレートの形状に合った温度調整ユニット及び溶液排出手段を備える装置を開発して、上記目的を達成することに成功し、本発明を完成した。

【0007】即ち、本発明の核酸配列検査方法は、酵素などで標識したDNAプローブ試薬でサンプル中の標的核酸をハイブリダイゼーションせしめることにより、サンプル中の標的核酸を測定する方法において、合成樹脂からなる筒状体の一方の開口部を閉塞するように少なくとも表面が親水性かつカチオン性である多孔質膜を開口縁部に接着又は圧着して底部となしたウェル型多孔質膜プレートを用い、その多孔質膜上に標的核酸を固定した後、ハイブリダイゼーション法により試料中の標的核酸を検出することを特徴とする。

【0008】より詳細には、本発明の核酸配列検査方法は、親水性かつカチオン性の多孔質膜プレートに試料を付着させる工程と、試料が付着した多孔質膜プレートに界面活性剤を含んだ酸又はアルカリ溶液を注入し試料を溶菌、変性させる工程と、酸又はアルカリ溶液を排出した後、ブロック溶液を注入して多孔質膜表面をブロックするプレハイブリダイゼーション工程と、ブロック溶液排出後酵素標識したプローブを注入して試料中の核酸と酵素標識プローブとのハイブリダイゼーションを行うハイブリダイゼーション工程と、プローブ液排出後洗浄液を注入してB/F分離を行うB/F分離工程と、洗浄液を排出後基質液を注入することにより発色又は発光反応を行ない発色又は発光量を検知する検出工程とを含む。多孔質膜への試料の付着は、サンプルがコロニーの場合には試料を直接塗り付けることによって行われ、液体培養サンプルの場合には試料を直接滴下することによって行われる。

【0009】本発明の核酸配列検査方法には、合成樹脂からなる筒状体の一方の開口部を閉塞するように、少なくとも表面が親水性かつカチオン性である多孔質膜を前記開口部の縁部に接着又は圧着した1ウェル型多孔質膜プレート、1ウェル型多孔質膜プレートを筒状体の側壁で結合して直線的に複数個連結したストリップ型多孔質膜プレート、又は上下が開口した複数の貫通孔をマトリックス状に配列して形成した板状樹脂部材の一方の表面に、前記複数の貫通孔の開口部を夫々閉塞するように少

なくとも表面が親水性かつカチオン性である多孔質膜を前記開口部の縁部に接着又は圧着して形成したウェル型多孔質膜プレートを用いる。

【0010】前記ウェル型多孔質膜プレートは、各々が加熱手段を有し、少なくとも一方が隣接面に凹部を有する上部金属ブロックと下部金属ブロックとからなる温度調整ユニットを有する本発明の核酸配列検査装置に収納して使用される。この温度調整ユニットの下部金属ブロックは、所定の領域を囲み、その上に載置されるウェル型多孔質膜プレートの底面と下部金属ブロックとの間に密閉空間を形成するシールパッキング部を上面に有すると共に、前記シールパッキング部で囲まれた領域と下部金属ブロックの外部空間とを連通させる連通孔を有し、吸引手段で連通孔を介して密閉空間を排気することでウェル型多孔質膜プレートのウェル内の溶液を吸引排出できる。

【0011】核酸配列検査装置は、溶菌及び/又は変性工程、プレハイブリダイゼーション工程、ハイブリダイゼーション工程、B/F分離工程、及び検出工程ごとに温度、工程時間、溶液の排出を制御できる制御手段を含むのが好都合である。通常核酸は負に帯電しているため、固定のための支持体である多孔質膜は正に帯電された膜の方が多量の核酸を固定でき、その結果感度も高くなる。親水性かつカチオン性の多孔質膜の材質としてはニトロセルロース、ナイロン、ポリ塩化ビニル等を使用することができる。多孔質膜のポアサイズは、小さい方が表面積も広くなり注入した液も保持しやすいが、目詰まりなどのトラブルも考えられるため、通常0.22～3μmが望ましい。

#### 【0012】

【作用】ウェル型膜プレートとして親水性かつカチオン性の多孔質膜を使用したことにより、負に帯電している核酸サンプルを滴下するだけで、核酸は膜上で静電的に結合し固定される。また、多孔質膜であるため、広い表面積が確保され、より多量の核酸を固定することができる。その結果、核酸検出の感度も高くなる。膜表面が親水性であるため、液状サンプルを滴下するだけでサンプルは膜に馴染み、またウェルに注入した試薬溶液を多孔質膜を通して吸引排出することができる。

【0013】本発明の核酸配列検査方法及び検査装置によれば、親水性かつカチオン性の多孔質膜を使用したことにより、培養したサンプルを前処理なしで直接滴下あるいは塗り付けるだけで核酸の高感度検出ができる。また、ウェル型膜プレートを使用するため、操作性が飛躍的に向上し、短時間で多量の検体を処理できる。

#### 【0014】

【実施例】以下に、本発明による核酸配列検査方法及び検査装置の一実施例を図面に基づいて詳細に説明する。図1は、本発明で使用するウェル型多孔質膜プレートの一例の外観図である。図1のウェル型多孔質膜プレート

10はマイクロプレート状で、各ウェル12の底面は多孔質膜で形成されている。合成樹脂からなるマイクロプレート状容器の底面への多孔質膜の接着は、超音波接着や熱融着などの方法で行われる。ウェルの容積は200～400μl程度、底面積は0.2～0.8cm<sup>2</sup>程度とするのが好ましい。

【0015】親水性かつカチオン性の多孔質膜としては、例えば市販のナイロンメンブレンを使用し、好ましくは、ポール社製バイオダインBやアマシャム製ハイボンドN+を用いる。多孔質膜の膜厚は10～50μm程度が好ましい。マイクロプレート状容器の本体は、ポリスチレン、66ナイロン、PVCなどの合成樹脂から成形される。

【0016】ウェル型多孔質膜プレートの形状は、図1に示すような96ウェル一体型のもの他にも、図2に示すような8ウェル毎のストリップ型、あるいは1個ずつ分離した1ウェル型とすることもできる。どのタイプにおいても、ウェルの底面は各ウェルの底部開口円周に接着させた多孔質膜で形成する。図3は、本発明の一実施例による核酸配列検査装置に図1に示すウェル型多孔質膜プレート10を設置した状態を示す図である。この核酸配列検査装置は、ウェル型多孔質膜プレート10をインキュベートするための温度調整ユニット20、温度調整ユニットを制御するためのコントローラ及びハイブリダイゼーションなどの各工程を開始するためのスイッチなどが設置された制御部50を有する。温度調整ユニット20は、フック21と孔22の係合によって閉じた状態を維持され、装置前面のレバー23を押すと、フック21と孔22の係合が外れて、図3に示すように開いた状態となる。

【0017】図4は、温度調整ユニット20の断面図である。温度調整ユニット20は、ウェル型多孔質膜プレート10中に注入された溶液を効率よく温度調整するために、ウェル型多孔質膜プレート10を熱伝導性の良い上下の金属ブロック24、25で完全に囲う構造となっている。熱伝導性金属ブロック材質としては、通常アルミニウムを用いる。上下の金属ブロックには、平面ヒーター26が取り付けられ、ヒーターを制御するための温度センサー27が金属ブロックに組み込まれている。それぞれのブロックのヒーター近辺には、金属ブロックを冷却するためのファン28が取り付けられている。ウェル型多孔質膜プレート10を下部金属ブロック25に設けられたシリコン等からなるシールパッキング部32上に設置後、カバー状の上部金属ブロック24を閉めることにより、上部金属ブロック24がウェル型多孔質膜プレート10の上面に接触し、熱伝導を効率よく行えるように工夫されている。

【0018】下部金属ブロック25は、シールパッキング部32上に多孔質膜プレート10を設置したとき、下部金属ブロック25と多孔質膜プレート10の間に、ウ

エル型多孔質膜プレート内の溶液を排出するための空間29が形成されるように構成されており、下部金属ブロック25には廃液をブロックより排出するための排出孔30が設けられている。排出孔30の出口は、液を排出するためのポンプと接続されている。下部金属ブロック25に設けられるシールパッキング部32等のシール機構はウェル型多孔質膜プレートの形状に応じて、即ちウェル型多孔質膜プレート10が96ウェル一体型であるか、ストリップ型又は1ウェル型であるかによって異なる。

【0019】図5は、ウェル一体型多孔質膜プレートを使用する場合のシール機構の例を示す断面図である。下部金属ブロック25には、ウェル一体型多孔質膜プレート10の外形寸法とほぼ同じ大きさのシールパッキング部32が設置されている。シールパッキング部32で多孔質膜プレート10の外周をシールし、上部金属ブロック24でカバーすることで多孔質膜プレート内の溶液部分と多孔質膜プレート下の廃液用空間29がシールされる。この状態で排出孔30に接続したポンプによって廃液用空間29のエアーを吸引すると、空間29が負圧状態となって多孔質膜プレートのウェル12内の溶液18がウェル底面の多孔質膜11を通して排出される。

【0020】図6は、ストリップ型又は1ウェル型の多孔質膜プレートを使用する場合のシール機構の例を示す。図6(a)はストリップ型又は1ウェル型の多孔質膜プレートを下部金属ブロック上に設置した状態での断面図であり、図6(b)はストリップ型又は1ウェル型タイプ多孔質膜プレートを固定するためのアダプタ40の上面図である。

【0021】ストリップ型又は1ウェル型の場合のシール機構は、ウェルを固定するためのアダプタ40を含んでいる。アダプタ40は、ポリプロピレン、ポリエチレン、塩化ビニール、ポリスチレン等の合成樹脂製で、好ましくは成形品であり、複数個の筒状ガイド42を有する。各筒状ガイド42の底面44はガイド部に比較して薄く成形され、かつウェルを押し込んだとき穴が開くように切れ目が入れられている。

【0022】ストリップ型多孔質膜プレート15又は1ウェル型多孔質膜プレートを本発明の核酸配列検査装置の温度調節ユニット20中に設置するには、まずアダプタ40の筒状ガイド42にウェル型多孔質膜プレートを押し込んで固定し、その後そのアダプタ40を下部金属ブロック25のシールパッキング部32の上に載置する。

【0023】各ウェル型多孔質膜プレートは、その筒状体の側面が筒状ガイド42の内面と密着シールされ、かつ筒状ガイド42に押し込むことによりガイドの底面に直径1mm以下の穴46が開く。一方、ウェル型多孔質膜プレートを設置しないガイド42の底面は閉塞された状態のままである。このようにして、廃液用空間29が

ウェル型多孔質膜プレート内の各溶液部分とシールされる。なお、アダプタ40の下部金属ブロック25との接触部分にシール部材を取り付けることにより、核酸配列検査装置本体のシールパッキング部32を省略することもできる。

【0024】図7は、核酸検出装置全体の構成図で、温度調整ユニット20の一部である下部金属ブロック25に設けられた排出孔30とポンプ60はチューブ62で接続され、ポンプ60で吸引された廃液は装置外の廃液タンク64へ排出される。装置には、その他にも温度調整用コントローラ55、工程制御用コントローラ56、タイマーなどが内蔵されている。

【0025】次に、前記核酸検出装置を用いた本発明による核酸の検査方法について説明する。例えば、試料を液体培地で培養した場合、培養サンプルをピペットで2~3μl採取し、多孔質膜プレートの各ウェルのまん中に滴下後、前記装置に設置し、以下の操作で核酸の検出を行う。試薬の注入は、手動で行う。

#### (1) 溶菌及び／又は、一本鎖工程

サンプルを添加した多孔質膜プレート内に界面活性剤を含んだNaOH、KOH等のアルカリ溶液を一定量注入後、カバーを閉じて溶菌、一本鎖工程を開始する。液温は設定した温度（例えば50℃）に温度コントローラで温度調整され、タイマーで設定した時間がくれば自動的にポンプが稼働し、多孔質膜プレートのウェル内の液は排出される。サンプル中の核酸は、本工程で菌体から溶出し、1本鎖の状態で多孔質膜に固定される。

【0026】(2) プレハイブリダイゼーション工程  
多孔質膜上で核酸が固定されたスポット以外をブロック溶液で覆うため、牛血清アルブミン(BSA)、カゼイソ等を含むブロック溶液を一定量注入後、カバーを閉じてプレハイブリダイゼーション工程を開始する。液温、及び時間は前記工程と同様に設定値で制御され、設定された時間が経過すれば、自動的にポンプが稼働し、ウェル内の液は排出される。本工程により多孔質膜上の核酸が固定されたスポット以外はブロック溶液で覆われ、サンプルも中和される。

#### 【0027】(3) ハイブリダイゼーション工程

酵素や蛍光物質で標識したDNAプローブを用い、上記サンプル中の核酸とハイブリダイゼーションを行わせるため、標識DNAプローブ試薬を一定量注入後、カバーを閉じてハイブリダイゼーション工程を開始する。液温、及び反応時間は前記工程と同様に設定値で制御され、設定された時間が経過すれば、自動的にポンプが稼働し、ウェル内の液は排出される。本工程によりハイブリダイゼーションが行われる。

#### 【0028】(4) B/F分離工程

ハイブリダイゼーション後のB/F分離を行うため、洗浄液を一定量注入し、カバーを閉じた後B/F分離工程を開始する。以下、上記と同様にしてB/F分離工程が

行われる。

#### (5) 検出工程

発色による検出の場合はニトロブルーテトラゾリウム(NBT)、5-プロモークロロー-3-インドリルリン酸溶液(BCIP)等の発色基質液を準備し、各ウェルに発色基質液を一定量注入後、カバーを閉じて発色工程を開始する。通常発色工程での液温は37℃であり、ハイブリダイゼーション工程での液温より低いため、発色工程開始と同時にファンを稼働し、温調温度を急速に下げる。前記工程と同様に設定時間が経過すれば、自動的にポンプが稼働し、プレート内の液は排出される。

【0029】各ウェルで、サンプルを添加したスポットの発色強度を目視、色差計、市販プレートリーダなどで読み取る。読み取り終了後の多孔質膜プレートは、乾燥状態で保存する。色差計での読み取りについては、特開平2-227099号公報に記載されている。検出方法として化学発光法を採用する場合、化学発光基質液として、ルミノール、アクリジニウムエステル、安定化ジオキセタン、過シュウ酸エステルなどを用いる。本検出方式の場合、検出工程で市販ルミノメータを用いれば定量的に検出できる。

【0030】前記一連の工程で、各工程の終了をブザーで知らせるようにすると、操作者はそれを合図にして装置のカバーを開け、次の工程の実行にかかることができるので便利である。次に、より具体的な実施例により、本発明の検査方法を説明する。

【0031】【実施例1】96ウェル型多孔質膜プレートを用いて、腸炎ビブリオ菌体の核酸検出を行った。96ウェル型多孔質膜プレートは、ポリスチレンからなるウェル本体の底面に親水性かつカチオン性の多孔質膜であるナイロン膜を熱融着によって接着して形成した。各ウェルの容積は約0.4cc、底面積は約0.3cm<sup>2</sup>とした。

【0032】サンプルは、TDH産生腸炎症ビブリオ菌株を液体培地で一晩培養した。液体培地よりサンプルを2μl取り、前処理を行わずに直接多孔質膜プレートの各ウェルに添加し、サンプルを多孔質膜に固定した。変性、1本鎖工程では、NaOHを含むアルカリ溶液を10μl注入し、50℃で10分間処理した。陰性検体として、ヒト胎児盤由来DNA(シグマ社)1μg/μlを1μg、多孔質膜ウェルに添加し同様に変性した。

【0033】変性後、アルカリ溶液をポンプで自動的に排出し、プレハイブリダイゼーション工程を行う。各ウェルにブロック溶液を200μl注入し、50℃で15分間プレハイブリダイゼーションを行った。プレハイブリダイゼーション工程の後、ブロック溶液をポンプで自動的に排出し、ハイブリダイゼーション工程を行う。アルカリホスファターゼ標識プローブ溶液を100μl注入し、50℃で15分間ハイブリダイゼーションを行った。

【0034】B/F分離工程では、洗浄液1（2×SSC, 1% SDS）、洗浄液2（1×SSC, 0.5%トリトンX-100）を準備する。洗浄液1を注入後50℃で15分間B/F分離を行った後、洗浄液2を加えウェル型多孔質膜プレートの各ウェル内の洗浄を行う。溶液は各工程終了後、ポンプで自動的に排出される。各ウェルに発色用基質液（ニトロブルーテトラゾリウム、5-ブロモ-クロロ-3-インドリルリン酸溶液）を100μl加え37℃で40分反応させた。発色工程終了後イオン交換水を注入／排出を繰り返すことで、発色用基質液を十分洗い流した。検出は、標準色彩サンプルと比較し目視にて陽性、陰性の判定をした。

【0035】【比較例】比較例として、従来技術であるドットプロット法を採用し、多孔質膜ウェルの代わりにナイロン膜（ハイボンドN+；アマシャム社）を使用した。培養後のサンプルを酵素、フェノール等で前処理することにより取り出した核酸を、ドットプロッター（BR社）に固定した膜上に2μlずつ滴下した。核酸を膜上に固定した後、膜を取り出し、ハイブリダイゼーション専用パック（ハイブリパック）に移し替え、実施例1と同様に酵素標識プローブを入れ、完全にシールした後、恒温水槽中に浸漬し、ハイブリダイゼーション反応を行わせた。反応終了後、別に用意したハイブリパックに移し替え、洗浄液を入れ、実施例1と同様に完全にシールした後、恒温水槽中に浸漬し、B/F分離を行った。以下、発色液の添加も実施例1と同様な操作を行い、発色反応を行った。

【0036】前記実施例1の方法でTDH産生腸炎症ビブリオ菌株50株、陰性検体として他の腸内細菌18株の検出結果を、従来のドットプロット法と比較した結果を表1に示す。表1から明らかのように、本実施例のウェル型多孔質膜プレートを用いた場合、比較例と同様の特異性が確認された。

### 【0037】

【表1】

		実施例	
		+	-
比較 例	+	50	0
	-	0	18

【0038】【実施例2】TDH産生腸炎症ビブリオ菌株を3%NaClブレインハートインヒュージョン培地に接種し、37℃で一晩培養した。生育したコロニーを白金耳でかきとり、実施例1で用いたのと同様の96ウェル型多孔質膜プレートの底面の膜に塗り付けた。以下、前記実施例1と同様な操作を行った。本実施例の方

法でTDH産生腸炎症ビブリオ菌株50株、陰性検体として他の腸内細菌18株の検出結果を、従来のドットプロット法と比較したところ、前記表1と同じ結果が得られた。

【0039】【実施例3】TDH産生腸炎症ビブリオ菌株を含む便検体をかきとり、希釈緩衝液（0.1Mリン酸バッファ）3.00μlに懸濁した。さらに、その中にプロテナーゼK 0.6mg、溶菌液（8M尿素、5.0mM EDTA）6.00μlを加えて搅拌し、60℃で30分間インキュベートした。得られた溶菌液をフェノールで2回、クロロホルムで1回抽出後、エタノール沈殿し、核酸を得た。次に、PCR用試薬に上記の方法で精製した核酸サンプルを1μl加え、核酸の増幅を行った。実施例1で用いたのと同様の96ウェル型多孔質膜プレートを用いて、増幅後のサンプルを2mlずつ膜プレート内に添加し、サンプルを膜に固定した。以下、前記実施例1と同様な操作を行った。本実施例の方法でTDH産生腸炎症ビブリオ菌株50株、陰性検体として他の腸内細菌18株の検出結果を、従来のドットプロット法と比較したところ、前記表1と同じ結果が得られた。

### 【0040】

【発明の効果】本発明の検査方法及び検査装置による、培養検体でも前処理の必要がなく、従来6時間以上かかっていた検出も2時間以内で可能となり、操作の簡便化及び検出時間の短縮を図ることができる。コロニー培地を用いた場合も、コロニーを多孔質膜プレート底面の多孔質膜に塗り付けるだけでよく、又PCRで増幅したサンプルを検出した場合も、液体培養サンプルと同様、2~3μlサンプルを滴下するだけでよい。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】96ウェル一体型多孔質膜プレートの外観図。

【図2】ストリップ型多孔質膜プレートの外観図。

【図3】核酸配列検査装置に多孔質膜プレートを設置した状態図。

【図4】温度調整ユニットの断面図。

【図5】一体型多孔質膜プレートに対するシール機構及びシールパッキング部の説明図。

【図6】ストリップ型またはウェル型多孔質膜プレートに対するシール機構及びアダプタの説明図。

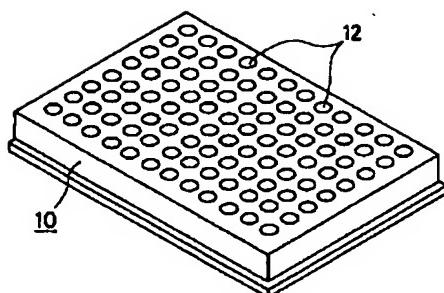
【図7】核酸配列検査装置の構成図。

#### 【符号の説明】

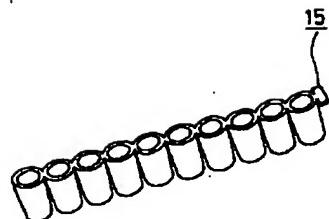
1.0…多孔質膜プレート、1.1…多孔質膜、1.2…ウェル、2.0…温度調整ユニット、2.4…上部金属ブロック、2.5…下部金属ブロック、2.6…平面ヒーター、2.7…温度センサー、2.8…金属ブロック冷却用ファン、2.9…廃液用空間、3.0…排出孔、3.2…シールパッキング部、4.0…ストリップ型及び1ウェル型多孔質膜プレート用アダプタ、4.2…筒状ガイド、5.0…制御部、5.5…温度調整用コントローラ、5.6…工程制御用コン

トローラ、60…ポンプ、64…廃液タンク

【図1】

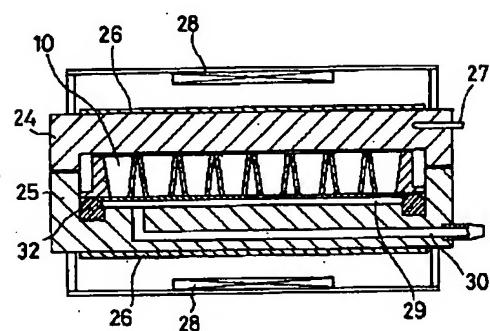
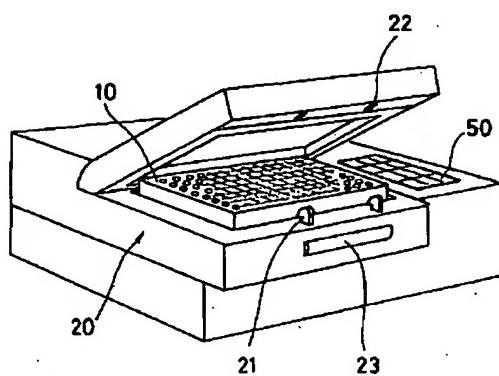


【図2】

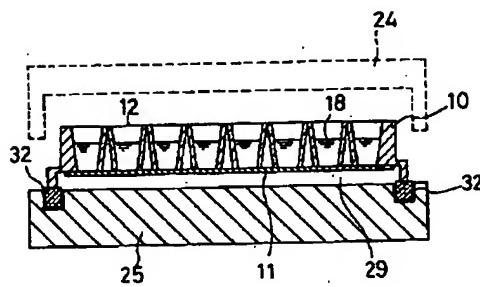


【図4】

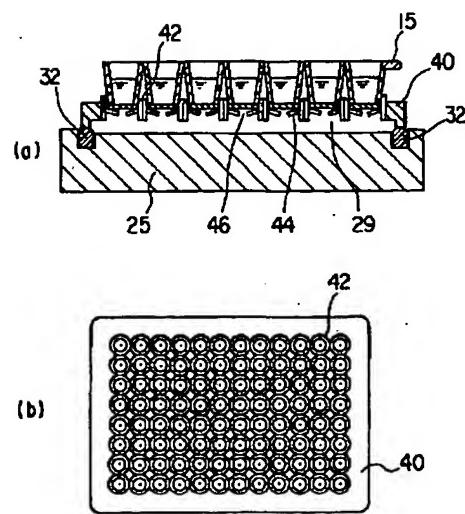
【図3】



【図5】



【図6】



【図 7】

